

THESIS

MUNICH

1964

Zur Kenntnis der Inhibitoren
der Fibrinolyse

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

GISELA NEUHAUS

Dissertationsdruck Franz Frank, München 23,
Werneckstraße 27, Tel. 34 36 51

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

Vorstand: Professor Dr. med. W. Büngeler

ZUR KENNTNIS DER INHIBITOREN DER FIBRINOLYSE

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gisela Neuhaus

aus

München

München 1964

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Büngeler

Dekan: Professor Dr. O. Hug

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.1964

Herrn Professor Dr. W. Büngeler danke ich für die
Übernahme des Referates.

Die Arbeit wurde ausgeführt in der Chemischen Abtei-
lung des Pathologischen Institutes der Universität Mün-
chen.

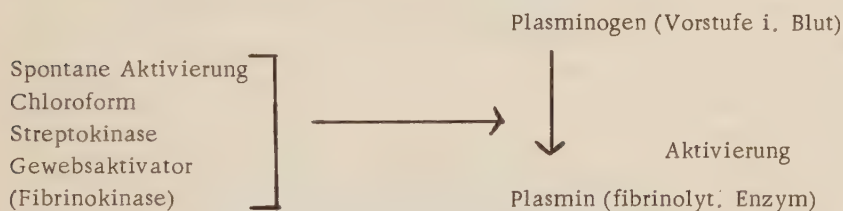
Herrn Dr. phil. Dr. med. H. Bayerle danke ich für
die Überlassung des Themas und die Anregungen in al-
len Stadien der Arbeit.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

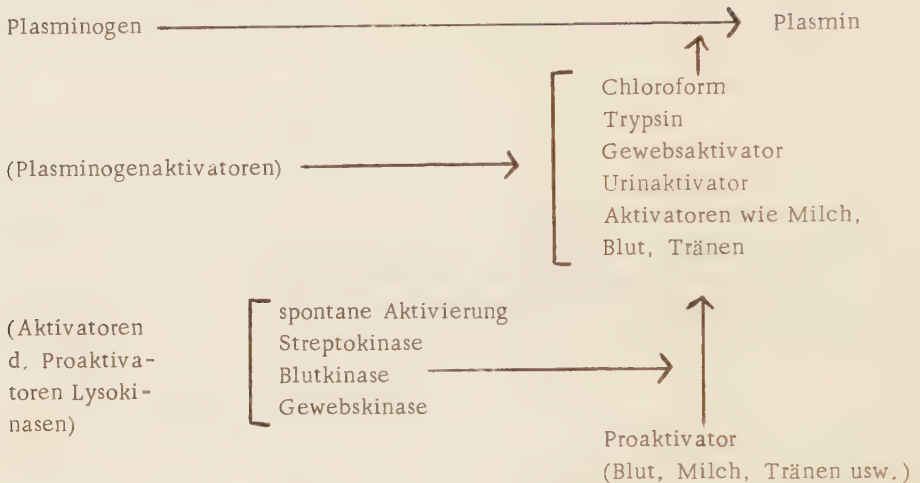
MEINER LIEBEN MUTTER

Die Forschungen des letzten Jahrzehnts über den biologisch wichtigen Vorgang der Fibrinolyse haben zu enzymologischen Erkenntnissen geführt, die sich am besten durch das nachfolgend wiedergegebene Schema von Astrup und Ma. (1) ausdrücken lassen.



Dieses Aktivierungsschema vom Jahre 1947 wurde 1954 auf Grund verschiedener Untersuchungen korrigiert. Astrup stellte fest, daß zwei verschiedene Enzymvorstufen im Blute vorhanden sein müssen, von denen die eine durch Gewebsaktivatoren und die andere durch Streptokinase und verschiedene andere Kinasen aktiviert wird. Die Streptokinase aktiviert das Plasminogen nur indirekt über das Proaktivatorensystem. Die Aktivatoren der Proaktivatoren werden "Lysokinasen" genannt. Wie die physiologische Aktivierung des Proaktivatorensystems vonstatten geht, ist noch nicht gelöst, da die Streptokinase eine dem Organismus fremde Substanz ist. Wenn auch von Astrup zu dieser Gruppe gehörige Substanzen in kleinsten Mengen im Blut und einigen Geweben gefunden wurden, so reichen diese Beobachtungen nicht aus, um den Vorgang als klargestellt betrachten zu können.

Aktivierungsschema aus dem Jahre 1954:



Demnach liegen beim proteolytischen System der Fibrinolyse weitgehende Analogien zum System der Blutgerinnung vor. So ist es verständlich, daß viele Autoren beide Prozesse koordiniert sehen, ja daß sie die Fibrinolyse sogar als spezielle Phase der Blutgerinnung betrachten.

Wie bei der Blutgerinnung gibt es bei der Fibrinolyse eine inaktive Vorstufe des Hauptferments (Plasminogen hier, Prothrombin dort). Die Umwandlung wird vollzogen unter Mitwirkung von Kinasen. Die Thrombokinasen im Fall der Blutgerinnung, entsprechen den zahlreichen Fibrinokinasen der Gewebe oder des Plasmas, Proaktivatoren, als Cofaktoren der Kinasen, werden ebenfalls in beiden Fällen angenommen und nachgewiesen. Dem vollaktiven Thrombin entspricht das vollaktive Plasmin.

Schließlich existieren in beiden Fällen auch Inhibitoren, die in ihrem Chemismus sogar weitgehend übereinstimmen.

Das jeweils vorliegende Verhältnis aller genannten Faktoren bestimmt Geschwindigkeit und Ausmaß der Fibrinolyse. Dem fast fulminanten Verlauf steht die totale Hemmung gegenüber.

Was nun die Inhibitoren betrifft, so ist seit langem bekannt, daß es sich um Albumine und Polypeptide des Serums und der Gewebsflüssigkeiten handelt.

Rosenmann (2) z.B. fand in Pleuraexsudaten einen Hemmstoff des fibrinolytischen Ferments, den er Thromboligin nannte. Er wird den Globulinen zugeordnet. Antifibrinolysine nach Astrup (3) finden sich in der Albuminfraktion. Dieses Antifibrinolyse kann durch Behandlung mit Äther oder Chloroform zerstört werden. Ähnlich wirken außerdem Hemmstoffe aus Soja-, Lima- und Navybohnen sowie aus Pankreas. (4) Ein anderer Inhibitor der Fibrinolyse ist die altbekannte ϵ -Aminocapronsäure, deren hohe antifibrinolytische Aktivität von japanischen Forschern (5) entdeckt wurde.

Sie ist chemisch der physiologischen Aminosäure Lysin nahe verwandt. Ihr Wirkungsmechanismus entspricht wahrscheinlich einer kompetitiven Hemmung. Die ϵ -Aminocapronsäure ist in erster Linie als Antiaktivator und erst in zweiter Linie als Antifibrinolyse zu betrachten. Es war nun recht bemerkenswert, daß beobachtet werden konnte, daß eine Hemmung fibrinolytischer Vorgänge nicht nur erfolgt bei Anwesenheit dieser eben beschriebenen, sozusagen klassischen Inhibitoren, sondern auch dann, wenn in einem Fibringerinnsel, auf dessen Auflösung es ankommt, korpuskuläre Formelemente bestimmter Art vorhanden sind. Sowie vor einiger Zeit Bayerle und Kirstein (6) auf die Bedeutung weißer Blutzellen, und R. Marx (7) auf einen Einfluß thrombocyitärer Elemente hin. Schließlich zeigte sich bei den Untersuchungen von Bayerle und Kammenhuber (8), daß schon die Beimengungen kleinster Mengen roter Blutkörperchen die Wiederauflösung eines Fibrinkoagulum verzögert.

Es ist nun die Aufgabe der vorliegenden Dissertation, Beiträge zu liefern zur Kenntnis dieser Art von Fibrinolyse-Hemmung durch die Formelemente des Blutes und durch korpuskuläre Elemente anderer Herkunft.

Für Kammenhuber (1.c.) war die vordringliche Frage, ob der Hemmungseffekt der Erythrocyten auf einen ihrer Inhaltsstoffe zurückgeführt werden könnte, auf einen Stoff, ähnlich den bisher bekannten Inhibitoren des Plasmas, der Exsudate, der Gewebe usw.. Auf dieses Arbeitsvorhaben waren seine Methoden ausgerichtet, und die Ergebnisse schienen den Vorstellungen und Überlegungen wenigstens teilweise zu entsprechen.

Kammenhuber zeigte:

1. Erythrocytenhaltige Fibrinkoagula, welche im Vergleich zu erythrocytenfreien Fibrinkoagula enzymatisch schon schwer löslich sind, werden nach Behandlung mit Aceton-Äther noch schwerer löslich.
2. Die Vorbehandlung der angewendeten Erythrocyten mit Aceton-Äther mit nachfolgendem Einschluß in Fibrin verstärkt ebenfalls die Hemmwirkung.

3. Auch die Vorbehandlung der Erythrocyten durch Hämolyse, Einwirkung organischer Lösungsmittel, also alles in allem die Anwendung strukturzerstörender Erythrocyten verstärkt den Hemmeffekt.
4. Werden aber Fibrinkoagula mit Einschlüssen der nach 1., 2. und 3. vorbehandelten Erythrocyten als Ganzes der Aceton-Äther-Behandlung unterworfen, so tritt nunmehr der Hemmeffekt zurück und äußert sich im Ergebnis der Kontrolle. Diese Regel zeigt sich aber nicht bei Anwendung von Hitze-einwirkung zum Zweck der Strukturzerstörung.
5. Wird von einem Hämolysat Überstand und Stroma getrennt angewandt, so ist zu beobachten, daß der Zentrifugatüberstand vorwiegend Inhibitorwirkung zeigt, die sich aber durch Aceton-Äther zurückdrängen läßt.

Zusammenfassend beurteilt, ließen die Kammenhuber'schen Ergebnisse also nur schwer eine Regel erkennen und erforderten weitere Experimente.

Außer der Frage zur Kenntnis über stoffliche Eigenschaften eines Erythrozyteninhibitors waren aber auch noch andere Probleme anstehend, so etwa die Frage nach einer Artspezifität: Gelten die Regeln für alle Erythrozytenarten und für alle Plasmen? Ferner: Welche Einzelphasen des Fibrinolysevorgangs werden gehemmt? Diese Frage erforderte die Untersuchung des Hemmeffekts bei Anwendung verschiedener Methoden. Oder: Wie verhalten sich kernhaltige Erythrozyten des Vogelblutes? Oder in Fortsetzung des Kammenhuber'schen Arbeitsprogramms: Wie müssen die Erythrozyten behandelt werden, um den Hemmeffekt zu zerstören?

Es wird nun in den nachfolgenden Abschnitten über eigene Experimente berichtet, die im Sinne der Durchführung des geschilderten Arbeitsprogramms ange stellt wurden. Es soll dies erfolgen, indem abschnittsweise eine Frage aufgeworfen, die Versuchsführung beschrieben, und das Ergebnis diskutiert wird.

1. Ist es eine generelle Eigenschaft der Erythrozyten fibrinolysehemmend zu wirken?

Es ist eine Vorbemerkung notwendig betreffend der Auswahl der Methoden der Fibrinolysebestimmung, die bekanntlich sehr unterschiedlich sind. Wir unterziehen sie einer kurzen Kritik, weil einige der eigenen Fragestellungen nur unter dem Aspekt der Methodik verständlich sind.

Wir unterscheiden und fassen zusammen zwei große Gruppen von Bestimmungsmethoden:

a) Die Messung der Fibrinolyse im arteigenen Plasma oder Serum.

Hierbei wird der Verlauf der Auflösung des dem Plasma zugehörigen Fibrins fortlaufend visuell qualitativ beobachtet oder quantitativ gemessen. Die Art der Messung der Fibrinauflösung wird dabei nach praktischen Gesichtspunkten vorgenommen. (Messung des nicht aufgelösten Fibrins oder Messung von Spaltprodukten des Fibrins). Vom enzymologischen Standpunkt aus betrachtet, läßt dieses Messungsprinzip keine speziellen Aussagen zu, weil ja zahlreiche Einzelfaktoren an dem Gesamtvorgang der Lysis Wirkungen ausüben. Es können also nur Aussagen gemacht werden über das Ausmaß der Fibrinolyse im Ganzen, nicht aber über Einzelfaktoren, über Kinasen, über das Plasminogen oder das Plasmin und nicht über die Hemmstoffe. Alle diese Faktoren können vorhanden sein, aber unwirksam oder teilweise wirksam und somit auch scheinbar abwesend.

Nun ist aber die Messung der Fibrinolyse in solch einem multivalenten System trotzdem sehr aufschlußreich, etwa in Bezug auf die Feststellung der Höhe eines "fibrinolytischen Potentials", um einen von Th. Halse (9) geprägten Begriff anzuwenden, und es könnte durchaus genügen, diese und keine zusätzlich andere Methode als Maßstab biologischer Vorgänge zu nehmen. Enzymologisch betrachtet, handelt es sich jedenfalls um eine reelle Fibrinolysehemmung, denn es steht Fibrin als Substrat im Mittelpunkt. Auch die Messung oder Beobachtung der Wiederverflüssigung von geronnenem Blut, Blutkuchen, Blutgerinnseln könnte in diese Kategorie von Fibrinolyse-messungen einbezogen werden, wenngleich hier der Einwand möglich ist, daß vielleicht nur Aggregatzustandsänderungen erfaßt werden, die noch nicht unbedingt als Ausdruck einer echten proteolytischen Auflösung des Fibrins im Sinne einer Fibrinmolekülverkleinerung zu bewerten wären. Denken wir etwa an Gaschlers Methoden der Fibrinolysebestimmung im Blut durch Messung der Freilegung von Hämoglobin aus vorher adsorbierten roten Blutkörperchen. Vielleicht ist auch eine unkritische Anwendung der sogenannten Thrombelastographie zur Messung der Fibrinolyse in diesem Zusammenhang betrachtet, ebenfalls bedenklich. Andererseits kommt der direkten Beobachtung der Verflüssigung des geronnenen Blutes sicher eine grose praktische Bedeutung zu, wenn es sich darum handelt, das "fibrinolytische Potential" in vivo durch therapeutische Maßnahmen zu beeinflussen.

b) Die Messung der Einzelfaktoren der Fibrinolyse.

Hier sind alle Methoden der Fibrinolyse einzubeziehen, die an vereinfachten Systemen arbeiten, sei es, daß Fibrin aus dem ursprünglichen Plasma oder Blut entnommen und in gereinigten Systemen, z.B. in Pufferlösungen oder in wässriger Lösung der Lysis unterworfen wird, sei es, daß Fibrinzubereitungen den Einflüssen fibrinolytisch aktiver Systeme unterworfen werden.

Auch die Anwendung anderer Substrate als Fibrin, nämlich z.B. Casein, Gelatine, andere synthetische Peptide oder chemisch veränderte Eiweißkörper z.B. Azokoll sind in diese Kategorie der Bestimmungsmethoden einzuordnen. Es ist klar, daß hier mit großen Vorbehalten beurteilt werden muß, denn alle diese genannten Substrate sind auch, bzw. sind zunächst Substrate vieler anderer proteolytischer Fermente, die dem "fibrinolytischen Ferment" zwar enzymologisch nahestehen, aber nicht mit ihm identisch sind. Man denke hier an Trypsin oder ähnliche Proteinasen. Auch die berühmte Fibrinplattenmethode von Astrup (10) und seiner Schule ist unter b) einzuordnen. Sie ermöglicht bei richtiger Anwendung und Variation Aussagen über aktives Plasmin, über die inaktive Vorstufe Plasminogen, über Kinasen. Das oben zitierte Schema der Einzelfaktoren konnte vielleicht gerade durch die Anwendung dieser Fibrinplattenmethode aufgestellt werden. Wenn es sich also um Einzelfaktoren handelt, wird man zu Detailmethoden greifen. Soll aber über den Gesamtvorgang Aufschluß gegeben werden, wird das komplette System, wie unter a) diskutiert, zu beobachten sein.

Wir haben die Erläuterungen unter a) und b) gebracht, weil die in den folgenden Abschnitten gestellten Fragen jeweils auch auf die Methodik Bezug nehmen. Grundsätzlich haben wir uns bei unseren eigenen Untersuchungen zweier Methoden nach den Kategorien a) und b) bedient.

Die Beantwortung der Frage I läuft auf Spezifitätsfragen hinaus. Bereits Kammhuber (1.c.) hat darüber orientierende Versuche angestellt. Wir haben sie vervollständigt und berichten darüber an Hand der nachfolgenden Tabelle I.

Tabelle I

Spezifität der Fibrinolysehemmung durch Erythrocyten verschiedener Tierarten und des Menschen

- Methodik:
- a) Plasmagewinnung: Das Citratblut der jeweiligen Tierart wird bei 45 00 U/min 14 Minuten lang zentrifugiert.
 - b) Erythrocytengewinnung: Bei einem anderen Teil des Citratblutes wird die spontane Sedimentation abgewartet. Dabei fielen zunächst die roten Blutkörperchen. Danach wird der Überstand, der weiße Blutkörperchen und Thrombocyten enthält, abgehebert und verworfen. Der rote Rückstand wird mit einer citrathaltigen 0.9 %igen NaCl-Lösung wieder aufgenommen und damit gewaschen. Hierauf überläßt man die Suspension sich selbst, hebert nach Absetzen der roten Blutkörperchen ab, um weitere restliche Anteile an Leukocyten und Thrombocyten zu entfernen. Schließlich zentrifugiert man noch fraktioniert bei geringer Tourenzahl, wodurch die Suspensionen weiter getrennt werden. Nach ca. 6- bis 7-facher Wiederholung erwiesen sich die nach May-Grünwald gefärbten Ausstrichpräparate, und die ungefärbten Präparate der Erythrocytensuspensionen als einheitlich, unbeschädigt und praktisch plasmafrei. Die Suspension wird auf eine bestimmte Verdünnung eingestellt, und zwar so, daß 1 ml ca. 10 000 Erythrocyten enthält.
 - c) Durchführung der Fibrinolyse: 1 ml bzw. 2 ml des scharf zentrifugierten Plasmas der jeweiligen Tierart werden zur Fibrinolysebestimmung verwendet. Es werden 3 Ansätze angestellt.

Ansatz a; 1 ml Plasma wird in einem Reagenzglas rekalkifiziert mit CaCl_2 -Lösung (580 mg %). Nach vollendeter Gerinnung wird das entstandene Fibrinkoagulum mechanisch mittels eines Drahthäkchens entfernt, 3 mal mit 1 ml NaCl 0.9 %ig plasmafrei gewaschen, mit Aceton und einer Mischung Aceton-Äther behandelt und im Exsikkator 5 Minuten lang getrocknet, hierauf in 2 bis 4 ml einer m/15 Phosphatpufferlösung von pH 7.8 übertragen, und ein Tropfen Toluol zur Verhinderung von Bakterienwachstum zugesetzt. Bei 37°C aufbewahrt, wird fortlaufend der Fortgang der Auflösung des Fibrinkoagulums beobachtet, und der

Endpunkt der Lysis, kenntlich an der völligen Lösung des Fibrins, als Lysiszeit (in Stunden gemessen) registriert. Es kann aber auch nach fixierten Versuchszeiten, z.B. 12 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, usw. registriert werden, wie das Fibrinkoagulum in dem beschriebenen Milieu vorliegt, z.B. "unverändert", "fast gelöst" oder "gelöst".

Ansatz b: Wie bei a wird nun die gleich große Plasmaprobe rekalkifiziert, hier aber das entstandene Fibrinkoagulum im eigenen Plasma als Ansatz b unverändert im Brutschrank sich selbst überlassen. Zuvor wird ebenfalls ein Tropfen Toluol zugesetzt. Auch hier gelten für die Bewertung der Lysis die bei Ansatz a angeführten Erläuterungen.

Ansatz c: Die dritte Probe wird wie bei a beschrieben angesetzt, jedoch ohne die Aceton-Äther-Behandlung.

Die drei Ansätze a, b und c sind standardisierte Kontrollansätze. Will man nun den Einfluß von Erythrocyten oder auch anderer Zusätze prüfen, so wird dem Plasma nach Rekalkifizierung, und zwar unmittelbar vor dem erwarteten, im Vorversuch ermittelten Gerinnungseintritt, das Objekt zugesetzt. Die Zusätze sind somit im Fibrinkoagulum eingeschlossen und entfalten ihre Wirksamkeit entweder hemmend oder aktivierend.

Die Bewertung wird durch Vergleich der Versuche ohne Zusatz (in der Tabelle I = Ka, Kb, Kc) mit den Versuchen a, b und c mit Zusatz der Erythrocyten vorgenommen.

Über den Aussagewert der Versuche a, b und c sind noch folgende Erläuterungen zu geben: Bei fast allen Plasmaproben von allen untersuchten Tieren läuft die Fibrinolyse am schnellsten bei Versuch a, bei dem Aceton-Äther Anwendung findet. Dies ist so zu erklären, daß durch diese Lösungsmittel Fermentinhibitoren zerstört werden, und somit das an Fibrin adsorptiv gebundene Plasmin aktionsfähig wird. Der Versuch c verläuft weniger schnell, weil die Inhibitoren, gleichfalls adsorptiv an Fibrin gebunden werden, aber ohne die Aceton-Äther-Behandlung wirksam sind. Der Vergleich a und c gibt somit zweifellos einen Hinweis auf die Qualität der an Fibrin gebundenen Inhibitoren. Der Versuch b verläuft am langsamsten, weil hier die Summe aller im Plasma vorhandenen Inhibitoren wirksam ist. Man kann schemamäßig die Regel aufstellen: Versuch a läuft schneller als c, und dieser schneller als b, oder $a > c > b$. Die Beifügung von Stoffen zum Fibrin oder zum Plasma wird sich nun so auswirken, daß dieses Schema so oder so umgestoßen wird, oder daß sämtliche Versuchszeiten von a, b und c im Vergleich zur Kontrolle verkürzt oder beschleunigt werden.

Plasma
von:

Angewendete Erythrozyten von:

	Mensch			Pferd			Rind			Kaninchen			Ratte			Schwein			Huhn		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Mensch	20	120	120	24	120	120	24	96	72	20	72	72	18	96	72	18	96	80	15	72	65
	K: 12	72	65																		
	24	140	140	24	144	140	24	150	120	20	96	96	24	144	96	24	140	72	20	96	96
Pferd	K: 14	96	96																		
	30	144	130	20	144	---	24	140	48	20	96	82	--	--	--	20	140	120	--	--	--
	K: 18	120	96																		
Rind	48	240	180	48	240	240	48	200	200	48	240	180	48	240	240	48	240	180	48	240	180
	K: 48	240	180																		
Kaninchen	18	120	120	20	120	110	24	144	120	18	120	120	18	120	96	18	144	120	20	120	72
	K: 12	96	72																		
Ratte	30	196	120	30	196	120	24	144	120	48	240	144	30	196	120	30	190	84	30	196	144
	K: 24	144	96																		
Schwein	24	96	96	24	96	72	--	--	--	24	96	72	24	120	120	--	--	--	24	120	96
	K: 20	72	48																		

Ergebnis: Bei den vorliegenden Fällen der Tabelle I finden sich ausschließlich Inhibitorwirkungen. Eine Regel im Sinne von Artspezifitäten läßt sich nicht erkennen. Alle Erythrozytenarten sind mehr oder minder stark hemmend. Es zeigt sich keine Gesetzmäßigkeit im Hemmungsgrad der Erythrozytenarten beim Wechsel der Plasmen, in denen sie inkubiert waren. Kaninchenblut zeigte, wie aus der Literatur bekannt, grundsätzlich lange Fibrinolysezeiten.

Zur weiteren Aufklärung des Hemmungseffekts schien uns angezeigt, die Verhältnisse bei den Vogelerythrozyten zu untersuchen. Diese sind kernhaltig und unterscheiden sich dadurch von allen anderen. Nun ist ja der Kern Träger vieler Fermente und anderer Wirkstoffe. So konnte dadurch auch erwartet werden, daß einige Besonderheiten des Hemmungseffekts gerade an diesem Objekt deutlich zum Vorschein kämen.

Wir beschreiben in den nachfolgenden Abschnitten unsere Versuche. Das leitende Prinzip war die Suche nach einem Inhaltsstoff der Vogelerythrozyten, der für die Hemmungseffekte verantwortlich sein könnte.

II. Läßt sich durch Hitzeeinwirkung die Hemmung durch kernhaltige Vogelerythrozyten aufheben ?

Durch Hitzeeinwirkung können bekanntlich native Proteine mit wenigen Ausnahmen denaturiert und koaguliert werden. Da die meisten Fermente über ein Trägerprotein verfügen, tritt bei Erhitzung fermenthaltiger Objekte naturgemäß auch eine Inaktivierung der Fermente auf; wenn also der fragliche Hemmungseffekt der Erythrozyten mit nativem Protein gekoppelt ist oder vielleicht Fermentcharakter hat, müßte eine Wärmebehandlung die Aufhebung der Hemmung zeigen.

Versuch: Vogelerythrozyten (Tauben) wurden plasmafrei gewaschen, dann in 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgenommen und in einem Wasserbad bei 90° 3 Minuten erhitzt. 0,1 ml des erhitzten Materials wurden mit 2,0 ml Citratplasma gemischt (3 Ansätze) und anschließend 2,0 ml Calciumchloridlösung beigelegt, so daß es zur Gerinnung kam. Der erste der drei Ansätze wurde wie folgt weiter behandelt: Mit Hilfe eines Drahthäkchens aus V 2A-Stahl wurde das Fibrin aus der Gallerte entfernt, anschließend in einem kleinen Glasschälchen mit Hilfe eines Gummistopfens das Serum ausgepreßt. Die Erythrozyten blieben dabei im Fibrinnetz eingeschlossen und sind auch durch das anschließende Waschen mit dreimal 1,0 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung nicht entfernbar. Hierauf wurde das Koagulum mit Aceton, Acetonäthermischung (1:1) und Äther, und durch kurzes Aufbewahren

ren im Exsiccator getrocknet. Das trockene Fibrin mitsamt den eingeschlossenen und getrockneten Erythrozyten bzw. deren Rückstände kam alsdann in 4,0 ml einer m/15 Phosphatpufferlösung von pH 7,8 und wurde in diesem Milieu bei 37° C aufbewahrt. Der Fortgang der Fibrinolyse wurde zeitlich verfolgt. Der zweite Ansatz (nachfolgend immer mit b bezeichnet) blieb unverändert sich selbst überlassen. Der dritte Ansatz (bezeichnet mit c) wurde wie der erste behandelt, also gleichfalls das Fibrinkoagulum mit den Erythrozyteneinschlüssen aus dem Serum entfernt, ausgepreßt und mit NaCl gewaschen, aber nicht wie bei a mit Aceton-Äther behandelt, sondern direkt in Pufferlösung überführt. Bei allen drei Ansätzen, (a, b und c) wurde der Zeitpunkt der beginnenden, der fortschreitenden und der vollendeten Fibrinlysis registriert, und die Dauer der Lysis in Stunden angegeben (Zahlen der nachfolgenden Tabelle). Zur Kontrolle bzw. zum Vergleich dienen drei Ansätze, die ohne Beifügung von Erythrozytenmaterial nach dem Schema a b c zubereitet wurden, und weitere drei Ansätze, bei denen frische, also nicht erhitzte Erythrozyten eingesetzt wurden.

Tabelle II

Einfluß erhitzter Vogelerythrozyten auf die Fibrinolyse

Ansatz:	a	b	c
Zusatzloses Plasma, bzw. Fibrin (=Kontrolle)	24 Std. gelöst	96 Std. fortschrei- tend	96 Std. gelöst
Plasma mit <u>frischen</u> Vogelerythrozyten, bzw. Fibrin mit eingeschlossenen <u>frischen</u> Erythrozyten	120 Std. beginnende Lysis	120 Std. beginnende Lysis	120 Std. beginnende Lysis
Plasma mit <u>erhitzten</u> Vogelerythrozyten, bzw. Fibrin mit eingeschlossenen <u>erhitzten</u> Erythrozyten	72 Std. gelöst	120 Std. beginnende Lysis	120 Std. unverändert

Wir finden folgendes Ergebnis: Die drei Minuten dauernde Erhitzung von Vogelerythrozyten bewirkt keine Aufhebung des Hemmeffekts. Gemäß der oben erläuterten Voraussetzung ist es somit unwahrscheinlich, daß der Hemmeffekt auf einen nativen Eiweißkörper oder ein Ferment zurückzuführen ist.

III. Verlieren Vogelerythrozyten nach Einwirkung organischer Lösungsmittel ihren Hemmeffekt auf die Fibrinolyse ?

Die Lösungsmittel Alkohol, Aceton, Äther u. a. haben auf den Fibrinolyseablauf eindeutigen Effekt. Es läßt sich zeigen, daß die Behandlung von plasminhaltigem Fibrin oder auch anderer plasminhaltiger Objekte mit den genannten organischen Lösungsmitteln die Fibrinolyse begünstigt oder überhaupt erst ermöglicht. Die Deutung dieses Effekts ist bei den verschiedenen Autoren unterschiedlich. Es ist wahrscheinlich so, daß durch Aceton und andere Lösungsmittel Hemmstoffe herausgelöst oder irreversibel zerstört werden, wodurch dann vorgebildetes Plasmin wirksam werden kann, oder daß zunächst in ihrer Wirkung blockierte Kinasen der Plasminogenumwandlung enthemmt werden. Es war naheliegend, den Hemmeffekt der Erythrozyten dadurch zu tilgen, daß Erythrozytenmaterial vor seinem Einsatz in Plasma und Fibrin einer Vorbehandlung mit den erwähnten organischen Lösungsmitteln unterworfen wurde.

Versuch: Gewaschene Vogelerythrozyten wurden a) mit Aceton-Äther, b) mit Alkohol und c) mit Chloroform versetzt, kurze Zeit leicht geschüttelt und schließlich die genannten Agentien durch Zentrifugieren und Evakuierung entfernt. Hierauf wurde das behandelte Erythrozytenmaterial mit 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgenommen (über die Mengen pro 1,0 ml siehe Tabelle I), und den Ansätzen 0,1 ml der Suspension zugefügt. Es wurden wie üblich die Versuche a, b und c durchgeführt. Anwendung findet Pferdeplasma bzw. daraus hergestelltes Fibrin.

Tabelle III

Einfluß der Behandlung der Erythrozyten mit organisch-chemischen Lösungsmitteln auf die Beeinflussung der Fibrinolyse

Ansatz			
Plasma, bzw. Fibrin ohne Zusatz (=Kontrolle)	24 Std. gelöst	120 Std. fortschreitend	96 Std. gelöst
Plasma, bzw. Fibrin mit Zusatz von Aceton-Äther behandelten Vogelerythrozyten	120 Std. gelöst	120 Std. unverändert	120 Std. unverändert
Plasma, bzw. Fibrin mit Zusatz von Alkohol behandelten Vogelerythrozyten	120 Std. gelöst	140 Std. unverändert	120 Std. unverändert
Plasma, bzw. Fibrin mit Zusatz von Chloroform behandelten Vogelerythrozyten	120 Std. gelöst	140 Std. unverändert	96 Std. gelöst

Zu den Versuchen der Tabelle III ist folgender Kommentar nötig: Die Behandlung von Zellmaterial, Sedimenten, Zelltrümmern und Extrakten mit Aceton bewirkt nach stattgefundener Koagulation des Eiweißes eine rasche Entwässerung bei gleichzeitiger Entfernung von Lipoiden. Dies bedingt in den meisten Fällen die Erhaltung von Fermenten, oder die Freilegung von solchen. Es wird vermutlich durch diese Maßnahme der native Charakter des Eiweiß erhalten oder höchstens nur reversibel verändert. So kann man Serumfermente durch fraktionierte Aceton-Fällung gewinnen (Cohn'sche Fraktionen) und stabilisieren. Die Behandlung mit Alkohol führt zu ähnlichen Effekten. Die Be-

handlung des Plasmins mit Chloroform, die wie seit langem bekannt ist, eine Aktivierung des Fibrinolytins (Plasmins) bewirkt, dürfte mit größter Wahrscheinlichkeit ebenfalls auf einer Entfernung von Inhibitoren, vielleicht von Lipoproteiden beruhen.

Wenn wir nun unter diesen Gesichtspunkten das Ergebnis der Tabelle III, nämlich die Unmöglichkeit, den Erythrozyten die hemmenden Eigenschaften durch Behandlung mit organisch-chemischen Lösungsmitteln zu nehmen, betrachten, so muß geschlossen werden, daß das Hemmungsprinzip nicht an Proteine oder Lipoproteide gebunden und nicht mit enzymatischen Aktivitäten koordiniert ist. Dieses Ergebnis steht in Parallele zu dem des Abschnittes II unter der dortigen Fragestellung.

IV. Welchen Einfluß hat die Strukturzerstörung der Erythrozyten auf den Hemmungseffekt?

Man muß hier unterscheiden zwischen einer mechanischen Zerstörung, die zum Beispiel durch intensive mechanische Homogenisierung oder durch Ultraschall und Vibration zu erzielen ist und einer chemisch-physikalischen durch Hämolysen mit anisotonischen Lösungen oder mit Saponin oder durch Kälteeinwirkung. Bei geeigneter technischer Durchführung solcher Prozesse ist es möglich, Zellfraktionen zu erzielen und zwar Kerne, Kerntrümmer und plasmatische Bestandteile. Durch Zentrifugieren kann eine Differenzierung erzielt und feste Bestandteile unterschiedlicher Größe und Überstände auf ihren Einfluß auf die Fibrinolyse untersucht werden. Wir beschreiben nachfolgend einige Versuchsergebnisse mit Erythrozytenmaterial, das durch Hämolysen mit destilliertem Wasser, mit Saponin und durch mechanische Zerstörung gewonnen wurde.

Versuche: Erythrozyten (von Taube, bzw. Huhn) wurden in Ringerlösung plasmafrei gewaschen, auf das zehnfache Volumen des ursprünglichen Blutes gebracht, und dann eine Probe mit dreifachem Volumen Aqua dest. versetzt, eine zweite Probe mit einem Glashomogenisator bei 0° Celsius zerstört und eine dritte Probe mit Saponin versetzt. Nach kurzem Stehen wurden die Hämolysate bei 6000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, und Überstände sowie Rückstände (= Sedimente aus Kerntrümmern bzw. Stroma) getrennt auf ihren Einfluß auf die Fibrinolyse untersucht. Die Ausführung der Ansätze, und die Auswertung waren dabei die üblichen. Von den Hämolysatüberständen wurden 0,2 ml dem Plasma beige-

fügt, dann rekalkifiziert, das gebildete Fibrin für die Versuche a und c gewaschen. Die Hämolysatrückstände wurden mehrfach mit NaCl gewaschen, im ursprünglichen Volumen suspendiert, ebenfalls zum Plasma gegeben und dieses rekalkifiziert u. s. w. Die Ergebnisse finden sich in der nachfolgenden Tabelle IV.

Tabelle IV

Der Einfluß hämolysierter und strukturzerstörter Erythrozyten
auf den Ablauf der Fibrinolyse

Ansätze	Zustand des Fibrins in den Ansätzen		
	a	b	c
Plasma bzw. Fibrin ohne Zusatz = Kontrolle	24 Std. gelöst	48 Std. gelöst	76 Std. gelöst
Plasma bzw. Fibrin mit Zusatz von homogeni- sierten Erythrozyten	24 Std. aufgequol- len	48 Std. beginnende Lysis	76 Std. gelöst
Plasma bzw. Fibrin mit dem Überstand der ho- mogenisierten Erythro- zyten	17 Std. völlig gelöst	48 Std. beginnende Lysis	120 Std. gelöst
Plasma bzw. Fibrin mit dem Rückstand der homo- genisierten Erythrozyten	24 Std. gequollen	48 Std. beginnende Lysis	-----
Plasma bzw. Fibrin ohne Zusatz = Kontrolle	30 Std. gelöst	126 Std. gelöst	76 Std. gelöst
Plasma bzw. Fibrin mit durch dest. Wasser hämo- lysierten Erythrozyten	126 Std. gelöst	146 Std. unverän- dert	146 Std. beginnend
Plasma bzw. Fibrin mit dem Überstand der hämo- lysierten Erythrozyten	30 Std. gelöst	126 Std. fortschrei- tend	126 Std. gelöst

Ansätze	Zustand des Fibrins in den Ansätzen		
	a	b	c
Plasma bzw. Fibrin mit dem Rückstand der hämolytierten Erythrozyten	54 Std. gelöst	146 Std. fortschreitende Lysis	146 Std. unverändert
Plasma bzw. Fibrin mit durch Saponin hämolytierten Erythrozyten	96 Std. fortschreitende Lysis	96 Std. weitgehend gelöst	96 Std. fortschreitende Lysis

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt beurteilen:

Es zeigten sich bei allen drei Arten der Hämolyse im Gegensatz zu den Ergebnissen von K a m m e n h u b e r (1. c.) mit den Erythrozytenrückständen Hemmungseffekte, die Hämolysatüberstände waren dagegen unwirksam. Daraus könnte man zunächst ohne weiteres schließen, daß das Hemmungsprinzip strukturverhaftet ist; andernfalls müßte der Rückstand unwirksam sein. Was den löslichen Anteil, also den Hämolysatüberstand betrifft, könnte angenommen werden, daß der Hemmstoff nicht an das Fibrin gebunden und somit im Verlauf der Durchführung der Versuche ausgewaschen wird. Dem steht aber entgegen, daß auch beim Versuchsansatz b das Hämolysat keine Inhibitorwirkung zeigt. Daraus ergeben sich Konsequenzen und Überlegungen. Entweder sind die angewendeten Hämolysmethoden als Mittel einer Erythrozytendestruktion nicht ausreichend, oder die Inhibitorwirkung beruht auf einem physikalischen Effekt. Es könnte sich dann um einen enzymatisch und biologisch zwar bedeutsamen, chemisch betrachtet aber, um einen vielleicht recht banalen unspezifischen Effekt handeln. Es wäre an einen Oberflächeneffekt zu denken. Es ist ja bekannt, daß Fermente des fibrinolytischen Systems an der Fibrinoberfläche haften. Wenn nun aber oberflächenaktive feste Bestandteile, hier Rückstände aus Hämolysaten, und die oberflächenaktiven Grenzflächen der Fibrinfasern um das Enzym konkurrieren, kann es letztlich zu einer Fibrinolysehemmung kommen. Da diese Vorstellung zunächst sehr theoretisch schien, mußten geeignete, die theoretischen Vorstellungen begründende Experimente durchgeführt werden. Diese Experimente mußten dahingehend variiert werden, daß man einerseits die Erythrozytenrückstände noch weiter chemisch behandelte, andererseits viele andere nicht aus Erythrozyten stammende Rückstände (corpuskuläre Elemente) untersuchte. Solche Rückstände

bieten sich dem Untersucher an in Form von Organhomogenaten, von Hefen, Bakterien, Tumoreinzellen und von anorganischen Materialien. Über entsprechende Versuche wird in den nachfolgenden Abschnitten berichtet.

V. Haben im Vergleich zu Säugetier- oder Vogelerythrozyten andere Zellen oder Zellfragmente verschiedener Herkunft in Bezug auf die Fibrinolyse eine Inhibitorwirkung ?

In Versuch genommen wurden

- 1) Homogenate von Organen
- 2) Tumorzellen des Ehrlich-Ascites-Karzinoms der Maus und Homogenate desselben
- 3) Pilzmycel von *Aspergillus niger*
- 4) Bakterien
- 5) Hefezellen (Bierhefe)
- 6) Leukozyten

zu 1) Es wurden die Organe einer normalen Ratte unmittelbar nach Tötung entnommen, dann wurden entsprechende Mengen eingewogen, mit der fünffachen Menge NaCl 0,9 % versetzt und unter Eiskühlung, so daß die Temperatur 3°C nicht überschritt, mit einem Glas-Homogenisator nach Potter / Elveyhem zerkleinert. Die Homogenate wurden anschließend bei 6500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, und die Überstände abpipettiert. Der Rückstand wurde zweimal mit 0,9 %igem NaCl gewaschen, in einigen Fällen auch über fünfmal, um eventuell störende lösliche Beimengen, wie z. B. Serum im Falle der Ascites-Tumorzellen zu entfernen. Die Rückstände wurden in dem ursprünglichen Volumen wieder aufgenommen und davon 0,2 ml zu den Ansätzen a) und b) gegeben.

Die weitere Auswertung der Ansätze erfolgte wie oben beschrieben. In den nachfolgenden Tabellen finden sich Angaben über das Verhalten von folgenden Organen: Milz, Leber, Niere, Hoden, Gehirn, Pankreas, Parotis und Submandibularis von Ratten.

Tabelle V

Beeinflussung der Lysis von Fibrin durch frische und erhitzte
Organhomogenatrückstände

Die Zahlen der Tabelle sind wie oben zu bewerten. Ein Kontrollversuch wird zwei Hauptversuchen gegenübergestellt, von denen der eine mit frischem Organmaterial, der andere mit erhitztem versetzt wurde. Die drei Versuche wurden jeweils mit der gleichen Plasmaprobe durchgeführt. Es mußte dabei aus technischen Gründen verzichtet werden, die Ansätze "c" zur Beurteilung heranzuziehen.

Ansätze	Lysiszeit in Stunden bei Versuch:	
	a	b
1) Kontrolle; Rekalzif. Plasma bzw. Fibrin ohne Zusatz	24	➤ 220
2) Zusatz von frischem Nierenhomogenat	30	➤ 220
3) Zusatz von erhitztem Nierenhomogenat	48	➤ 220
1) Kontrolle	18	➤ 60
2) Zusatz von frischem Pankreashomogenat	➤ 60	➤ 60
3) Zusatz von erhitztem Pankreashomogenat	➤ 60	➤ 60
1) Kontrolle	24	240
2) Zusatz von frischem Milzhomogenat	30	240

Ansätze:	Lysiszeit in Stunden bei Versuch:	
	a	b
3) Zusatz von erhitztem Milzhomogenat	40	240
1) Kontrolle	24	108
2) Zusatz von frischem Leberhomogenat	108	108
3) Zusatz von erhitztem Leberhomogenat	108	108
1) Kontrolle	24	240
2) Zusatz von frischem Lungenhomogenat	30	240
3) Zusatz von erhitztem Lungenhomogenat	30	240
1) Kontrolle	40	---
2) Zusatz von frischem Parotishomogenat	40	---
3) Zusatz von erhitztem Parotishomogenat	48	---
1) Kontrolle	40	232
2) Zusatz von frischem Submandibularishomogenat	56	16
3) Zusatz von erhitztem Submandibularishomogenat	56	150

Ansätze:	Lysiszeit in Stunden bei Versuch:	
	a	b
1) Kontrolle	40	---
2) Zusatz von frischem Lymphknotenhomogenat	40	---
3) Zusatz von erhitztem Lymphknotenhomogenat	48	---
1) Kontrolle	16	> 300
2) Zusatz von frischem Hodenhomogenat	16	> 300
3) Zusatz von erhitztem Hodenhomogenat	16	> 300
1) Kontrolle	42	90
2) Zusatz von frischen Leukozyten	> 90	90
3) Zusatz von erhitzten Leukozyten	> 90	90

Eine Diskussion der Ergebnisse findet sich unten nach Tabelle VI.

Besondere Erwartungen knüpften sich an Untersuchungen von Tumorasiteszellen des Ehrlich -Ca der Maus. Dieses Objekt ist ja zahllosen enzymologischen Untersuchungen unterworfen worden. So wurde auch die protolytische Aktivität, die Spaltung kleiner und größerer Peptide, besonders unter dem Gesichtspunkt der Malignität geprüft. Die Ansichten darüber sind bei verschiedenen Autoren

bekanntlich sehr unterschiedlich; gesteigerte Proteolyse und gehemmte Proteolyse sind die beiden gegensätzlichen Auffassungen. Auch die Fibrinolyse wurde im Rahmen solcher Untersuchungen herangezogen. Darüber vorliegende Ergebnisse sind wenig aufschlußreich. Unsere eigenen einschlägigen Untersuchungen haben wir nicht im Hinblick auf das Malignitätsproblem, sondern zur Frage der Inhibitorwirkung durchgeführt.

Die Versuchsanordnung war folgende:

Am 8. Tag nach intraperitonealer Überimpfung des Tumormaterials wurde einer Maus Ascites entnommen. Dieser Ascites wurde zentrifugiert, und die sedimentierten Tumorzellen mit Ringerlösung gewaschen. Die Zellen wurden im ursprünglichen Volumen suspendiert, 0,2 ml der Zellsuspension dem Plasma beigelegt und die üblichen Fibrinolyseansätze durchgeführt.

Tabelle VI

Einfluß von Tumorasciteszellen auf fibrinolytische Prozesse

Durchführung der Versuche wie oben bei Tabelle V.

Ansatz	Lysiszeit in Stunden bei Versuch:	
	a	b
Kontrolle	17 Std.	96 Std.
Plasma bzw. Fibrin mit frischen Asciteszellen	96 Std.	96 Std.
Plasma bzw. Fibrin mit homogenisierten Ascites- zellen	48 Std.	96 Std.
Plasma bzw. Fibrin mit erhitzten Asciteszellen	72 Std.	96 Std.

Ergebnis:

Das Ergebnis zeigt prinzipiell Gleiches. Der Einsatz von morphologisch intakten Zellen des Ehrlich-Ascitestumors der Maus in das System des Plasmas bewirkte eine beträchtliche Hemmung der Fibrinolyse. (Mehr als 96 Std. gegenüber 17 Std. bei der Kontrolle). Die vorhergehende Erhitzung der Tumorzellen bewirkte eine Verminderung der Hemmwirkung, die aber immer noch beträchtlich war. (72 Std. gegenüber 17 Std.). Dies würde bedeuten, daß die Inhibitorwirkung an den nativen Zustand der Zellen gebunden ist. Dies ist eine plausible Vorstellung, denn Inhibitoren der Fibrinolyse sind ja im Plasma als native Eiweißkörper enthalten. Schwieriger ist die Deutung des Versuches mit den homogenisierten Zellen. Hier findet man auch noch eine Hemmung im Vergleich zur Kontrolle, aber im Vergleich zu den frischen oder erhitzten Tumorzellen ist sie erheblich geringfügiger. Man könnte die Meinung vertreten, daß durch die Homogenisierung Fermente der Proteolyse freigelegt werden, welche dann mit den vorliegenden Inhibitoren in ein Gleichgewicht kommen. Zwei Vorgänge ständen sich somit gegenüber: die bisher nicht befriedigend deutbare Hemmwirkung der intakten Zellen (wie sie auch bei anderen korpuskulären Elementen zu beobachten ist), und die proteolytische Auflösung des Fibrins durch freigelegte Proteinasen.

Es ergäbe sich dann folgende Gesetzmäßigkeit: Intakte korpuskuläre Elemente; Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten, Einzeltumorzellen hemmen. Nach Homogenisierung, welche Enzymfreilegung bewirkt, können die Hemmeffekte zurückgedrängt werden, nach Behandlung durch Erhitzen, gleichbedeutend mit der Zerstörung der Fermentwirkung, wird die Inhibitorwirkung wieder deutlich. Auch Organhomogenate verhalten sich ähnlich. (Siehe oben Tabelle V.) Sind sie proteolytisch aktiv, wie zum Beispiel *Glandula submandibularis*, so verschwindet die Inhibitorwirkung. Werden sie erhitzt, (Zerstörung der Fermentwirkung), so ist sie wieder zu beobachten. Organhomogenate, die nicht deutlich proteolytisch aktiv sind, sind immer auch Inhibitoren, gleichgültig ob sie erhitzt oder nicht erhitzt werden.

Wir haben nun weiterhin geprüft, ob sich an anderem Material diese Regel bestätigen läßt, und haben Mikroorganismen, Hefen, Schimmelpilze und Bakterien in die Untersuchungen einbezogen. Es wurden Bäckerhefe, *Aspergillus niger* und eine Mischkultur von Bakterien nicht näher bestimmter Species verwendet.

Tabelle VII

Einfluß frischer und erhitzter Hefe-, Schimmelpilz-zellen und Bakterien
auf den Ablauf der Fibrinolyse

Die Mikroorganismen wurden in geeigneter Menge mit NaCl 0,9 % aufgeschwemmt. Die Durchführung der Fibrinolyseversuche, ihre Auswertung, ihre Aufschreibung entspricht in allen Fällen dem oben gegebenen Modus,

Ansätze	Lysiszeit in Stunden bei Versuch	
	a	b
1) Kontrolle;	24	96
Plasma bzw. Fibrin mit Zusatz frischer Hefezellen	30	96
Plasma bzw. Fibrin mit Zusatz er- hitzter Hefezellen	30	96
2) Kontrolle;	19	96
Plasma bzw. Fibrin mit Zusatz einer Schimmelpilzsuspension	19	96
Plasma bzw. Fibrin mit Zusatz von erhitzter Schimmelpilz- suspension	19	96
3) Kontrolle;	16	72
Plasma bzw. Fibrin mit Zusatz von Bakteriensuspension	16	72
Plasma bzw. Fibrin mit Zusatz von erhitzter Bakteriensuspension	24	96

Ergebnis:

Auch bei diesen Objekten ist mit Ausnahme der Schimmelpilzprobe der Effekt der Hemmung erkennbar, wenn er auch nicht annähernd an das Ausmaß der Hemmung bei den Tumorzellen herankommt.

Wir versuchen aus dem sehr umfangreichen Versuchsmaterial einige Prinzipien abzuleiten. Wir finden in den Versuchsansätzen der Spalten a) b) c) drei Kategorien, nämlich "Fibrinolyse unbeeinflusst", bzw. "Fibrinolyse beschleunigt" oder schließlich "Fibrinolyse gehemmt". Alle drei Kategorien werden in Beziehung zu einem Kontrollversuch mit zusätzlichem Plasma oder Fibrin gebracht.

Zur ersten Kategorie "Fibrinolyse unbeeinflusst" gehören: frisches Lungen-, Nieren-, Gehirn-, Hodenhomogenat, Bakteriensuspensionen, Schimmelpilzsuspensionen, erhitztes Parotishomogenat und erhitztes Lymphknotenhomogenat.

Die zweite Kategorie, "Fibrinolyse beschleunigt": frisches Submandibularishomogenat im Ansatz b); beim Erhitzen ist die Beschleunigung geringer.

Die dritte Kategorie: "Fibrinolyse gehemmt": Milz-, Leber-, Pankreashomogenat, erhitztes Lungen- und Nierenhomogenat, frisches Parotishomogenat, Submandibularishomogenat im Ansatz a), frisches Lymphknotenmaterial, frische und erhitzte Leukozyten, (bei homogenisierten Leukozyten ist dagegen die Hemmung auffallend geringer), frische und erhitzte Tumor-Asciteszellen, (bei homogenisierten ist die Hemmung wiederum geringer), und Hefezellen. Aus der Übersicht über die Versuchsergebnisse der Tabelle IV und über die anschließend abgeleiteten Kategorien läßt sich eine Theorie entwickeln, die man wie folgt formulieren könnte: Alle Objekte, die, wie in Parallelversuchen gezeigt werden konnte, allgemein proteolytisch aktiv sind, gehören zur Kategorie der Fibrinolyseförderer. Dies ist ja selbstverständlich, ist doch Fibrin nicht nur Substrat des Plasmins, sondern auch Substrat aller anderen Proteinasen bei der entsprechenden H^+ -Ionen-Konzentration. Wenn nun aber diese Objekte, Zellen, Homogenate usw. erhitzt, also fermentativ unwirksam gemacht werden, sind sie in die drittgenannte Kategorie einzureihen, d. h. sie entfalten dann Inhibitorwirkung.

(Beispiele: Lymphknotenhomogenate aus menschlichem Sektionsmaterial verschiedener Regionen, bei denen postmortale Prozesse schon eingesetzt haben, erwiesen sich fibrinolysefördernd. Gegenüber Kasein zeigten sie sich proteolytisch beachtlich aktiv. Erhitzt man sie einige Minuten, so verlieren sie ihre proteolytische Aktivität gegenüber Fibrin und Kasein, gleichzeitig werden sie aber auch fibrinolysehemmend. Ein anderes Beispiel: Intakte, frische Tumorasцитeszellen des EHRlich-Mäuse-Ca. sind im Fibrinolyseversuch trotz Reinigung von

hemmenden Eiweißbestandteilen proteolytisch kaum meßbar wirksam. Durch Homogenisierung wird ihre Struktur zerstört. Dies aber ist gleichbedeutend mit Freilegung von Fermenten. Erhitzt man nun solches Material, so zeigt sich wieder Inhibitorwirkung. Ein weiteres Beispiel: Unter den vielen untersuchten Rattenorganen findet sich eines, nämlich die Glandula submandibularis, welche bemerkenswert proteolytisch aktiv ist. Diese proteolytische Aktivität zeigt sich gegenüber allen Proteinen, auch im Fibrinolyseversuch gegenüber Fibrin, oder im Plasma gegenüber Fibrin. Erhitzt man Homogenate aus solchen Drüsen, so verlieren sie erwartungsgemäß ihre fibrinolytische und proteolytische Aktivität. Gleichzeitig werden sie sogar hemmend.)

Es gilt nun, für diese und ähnliche Inhibitorwirkungen eine Erklärung zu finden. Es ist K a m m e n h u b e r (1.c.) nicht gelungen, die Inhibitorwirkung der Erythrozyten chemisch-stofflich zu erklären. Inhibitorsubstanzen der bisher bekannten Art lagen nicht vor. Es ist in den vorliegenden Untersuchungen auch nicht gelungen, durch Anwendung kernhaltiger Vogelerythrozyten zu einem Resultat zu gelangen. Es wurden zahlreiche andere Objekte gefunden und beschrieben, die einen den Erythrozyten ähnliches Verhalten zeigten, ohne aber mit ihnen funktionell Gemeinsames zu haben. So drängt sich die Vermutung auf, daß es sich vielleicht um einen allgemein wenig spezifischen physikalischen Effekt handeln könnte. Es könnte an eine Oberflächenerscheinung gedacht werden. Es ist ja bekannt, daß die Oberfläche, sogar der Reaktionsgefäße *in vitro*, auf Vorgänge der Blutgerinnung einwirken. In Bernsteingefäßen, in paraffinierten oder in silikonisierten Gläsern kann die Gerinnung von Vogelblut und von Säugetierplasma verhindert oder verzögert werden. Auch für die Fibrinolyse haben vor einiger Zeit M a r x und Mitarbeiter (11) gezeigt, daß Oberfläche und Lumen der Glasgefäße für das Ausmaß der Fibrinolysegeschwindigkeit bedeutsam ist. Um wieviel mehr könnten Oberflächeneffekte bei unseren Objekten eine Rolle spielen.

Das Fibrin mit seiner Netzstruktur verfügt bekanntlich über beträchtliche adsorptive Eigenschaften. Nicht nur die korpuskulären Elemente des Blutes werden im Fibrinnetz eingefangen, sondern auch Makromoleküle werden adsorbiert. Für die Fibrinolyseeinleitung, -fortgang und -beendigung bedeutsam ist die Adsorption des Fermentes Plasmin oder seines Proferments Plasminogen. Ihre Anwesenheit bedingt die Lysis. Es ist der Kontakt zwischen Substrat und Ferment, der die physikalische Voraussetzung für den fermentativen Abbau schafft. Wenn nun andere Stoffe, seien es Wirkstoffe oder spezifische Inhibitoren, seien es indifferente, unspezifische Körper, die Oberfläche des Substrats Fibrin blockieren, dann muß sich das mehr oder minder stark in der Geschwindigkeitsverminderung ausdrücken.

Das nachfolgend gezeichnete Schema möchte dies zum Ausdruck bringen.



Links die Fibrinfasern beladen mit Plasminferment,
rechts Fibrinfasern beladen mit Inhibitoren (schraffierte Punkte) und nur wenig
Ferment.

Wirkstoffe, hier Plasmin und Plasminogenkinasen und korpuskuläre, morphologisch strukturierte oder auch strukturlose Elemente konkurrieren um die Oberfläche des Substrats. Es ist von dieser Vorstellung her auch verständlich, daß innerhalb der hemmenden Elemente auch graduelle Unterschiede bestehen. In diesem Zusammenhang ist nicht uninteressant das Verhalten anorganischer, oberflächenaktiver Stoffe, deren Fähigkeit Fermente zu adsorbieren seit langem praktische Anwendung findet, z.B. Aluminiumoxyd, bzw. -hydroxyd, Tierkohle, Kieselgur, Kalziumphosphat und ähnliches. Es konnte erwartet werden, daß der eine oder andere dieser Stoffe vermittels seiner aktiven Oberfläche Einfluß auf den Ablauf der Fibrinolyse haben könnte. In der folgenden Tabelle sind Ergebnisse über solche Versuche angeführt,

Tabelle VIII

Einfluß anorganischer Stoffe auf den Ablauf der Fibrinolyse

Fibrinogen (der Firma Behring, Marburg) wurde in NaCl 0,9 % gelöst. 1,0 ml, enthaltend 6,0 mg Fibrinogen, wurde mit den in der Tabelle, Spalte 2, angegebenen Substanzen (5,0 mg), versetzt und mit Thrombin zur Gerinnung gebracht. Das im verwendeten Fibrinogenpräparat enthaltene Plasmin bringt das Fibrin in der in der 3. Spalte angegebenen Zeit zur Auflösung. Diese Zeit (in Stunden) wurde registriert. Als Blindversuch dient Fibrin aus Fibrinogen ohne Zusatz.

Versuchsprotokoll No.	Zusatz von:	Lysiszeit in Stunden:
H81/28. 10. 59	Kein Zusatz (Blindversuch)	2
H84/ "	Tierkohlesuspension	8
H85/ "	Kieselgursuspension	8
H86/ "	Tricalciumphosphat	7
H87/ "	Aluminiumhydroxyd	8
H88/ "	Eisenhydroxyd	9

Es handelt sich auch hier um Modellversuche. Einige Ergebnisse sind interessant im Hinblick auf das Silikoseproblem. Kieselgur erweist sich als fibrinolysehemmend. Es ist dies bemerkenswert. In vivo würde an Orten einer Kieselsäureablagerung ein bei entzündlicher Reaktion entstandenes Fibrin proteolytisch nicht abgebaut, sondern organisiert werden, d.h. aber doch bindegewebig ersetzt werden. Es sind dies natürlich spekulative Überlegungen. Andererseits gibt es genügend Fälle, an denen die Folgezustände einer gehemmten Fibrinolyse eklatant sind.

Es ist auch verständlich, daß die Menge des adsorbierten Materials, etwa der Erythrozyten usw. Einfluß auf die Lysis eines Thrombus hat. Die Fragilität eines

Fibrinnetzes und damit auch gleichzeitig die Konsistenz eines Thrombus wird beeinflusst. Es ist fast sicher, daß manche in vitro beschleunigten Lysisfälle eines Blutkoagulums gar nicht so sehr ein Ausdruck für eine Plasminaktivität sind, sondern ein Ausdruck für eine Strukturveränderung des Fibrinnetzes, die durch Retraktionsvorgänge verursacht sein können.

Nach Abschluß unserer Untersuchungen erschien eine Arbeit von W. Künzer und D. Haberhausen (12) aus der Universitätsklinik in Freiburg über die fibrinolytische Aktivität von Erythrozyten des Menschen und bestimmter Tiere, die wir hier referieren und diskutieren möchten.

W. Künzer und D. Haberhausen verwendeten für ihre Versuche:

- 1) Gewaschene Erythrozyten vom Menschen, Hämolysat mit Stromaten, hämoglobinarne Stromaten,
- 2) Gewaschene Erythrozyten von Tieren (Rind, Pferd, Schwein, Schaf, Meerschweinchen), Hämolysat mit Stromaten, hämoglobinarne Stromaten.

Sie arbeiteten mit der Fibrinplattenmethode unter Verwendung von Rinderfibrinogen (Behring), Antithrombinreagens (Roche), Varidase (Lederle). Gewaschene Erythrozyten wurden nach der üblichen Methode gewonnen. Hämolysate wurden durch Wasser und anschließendes Einfrieren und Auftauen erzielt. Stromatareiche Hämolysate wurden durch langes Zentrifugieren bei 16000 U/ min gewonnen. Um hämoglobinarne Stromaten herzustellen, wurden stromatareiche Hämolysate 1/2 Stunde lang bei 6000 U/ min zentrifugiert, und das Sediment mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Die Fibrinolyse wurde bestimmt, indem die Fibrinplatten mit der Restsubstanz beimpft und 24 Stunden lang bei 37 ° im Brutschrank aufbewahrt wurden. Die fibrinolytische Aktivität zeigte sich im Auftreten eines mehr oder minder grossen Lysishofes. Außerdem wurde noch die fibrinolytische Aktivität der Testsubstanzen geprüft nach Zugabe von Streptokinase.

W. Künzer und D. Haberhausen kamen bei den Versuchen mit Erythrozyten vom Menschen zu folgenden Ergebnissen:

- a) Intakte menschliche Erythrozyten verursachen weder auf erhitzten noch auf nicht erhitzten Platten Lyseerscheinungen, ebenfalls nicht nach Inkubation der Erythrozyten mit Streptokinase.
- b) Stromatareiche Hämolysate verhielten sich in ihrer fibrinolytischen Aktivität abhängig von ihrer Hämoglobinkonzentration. Bei normaler HB-Konzentra-

tion von 12g % trat eine weitgehende Hemmung auf. Die stärkste fibrinolytische Wirkung zeigte sich bei 6g%-igen Hb-Lösungen. Auch auf erhitzten Platten zeigten die Hämolsate eindrucksvolle Lysishöfe. Zusatz von Streptokinase vermochte die Lysekraft zu steigern.

c) Stromatafreie Hämolsate verhielten sich wie Erythrozyten. Es kam weder auf nicht erhitzten noch auf erhitzten Platten zu irgendeiner Lyseerscheinung. Zusatz von Streptokinase bewirkte keine Aktivierung eines hämolsateigenen Enzyms.

II. Bei den Versuchen mit Tiererythrozyten ergab sich folgendes:

a) Intakte Rindererythrozyten verursachen ebenfalls keine Lyseerscheinungen. Zusatz von Streptokinase brachte keine Änderung. Stromatareiche Hämolsate übten nach Streptokinasezusatz auf nicht erhitzten Platten eine geringe Lysewirkung aus, auf den erhitzten keine oder keine nennenswerte. Hämoglobinarne Stromaten erzeugten mit und ohne Streptokinasezusatz praktisch gleich große Aufhellungszonen. Ein Einfluß der Streptokinase war nicht zu bemerken. Im Vergleich zu den menschlichen Stromaten ergab sich, daß diese stets eine erheblich größere Lysekraft besaßen.

b) Pferde- und Schweineerythrozyten verhalten sich ähnlich. Intakte Zellen zeigen keine Aktivität. Wurden nichtaktivierte stromatareiche Hämolsate verschiedener Hämoglobinkonzentration auf erhitzte und nicht erhitzte Platten aufgetragen, so trat keine Lyse auf. Nach Streptokinasezusatz wurde eine geringe fibrinolytische Aktivität nur auf den nicht erhitzten Platten sichtbar. Bei Verwendung von hämoglobinarnten Stromaten kamen sowohl auf erhitzten als auch auf nicht erhitzten Platten Aufhellungszonen zustande. Streptokinase führte vor allem auf nicht erhitzten Platten zu deutlicher Lysesteigerung. Auch im Vergleich hierzu waren menschliche Stromaten von weit größerer Wirksamkeit.

c) Von Hammel- und Meerschweinchenerythrozyten zeigten weder intakte Erythrozyten noch stromatareiche Hämolsate, noch hämoglobinarne Stromaten Zeichen einer fibrinolytischen Aktivität.

Diskussion: Von W. Künzer und D. Haberhausen wurde also festgestellt, daß hämolsierte menschliche Erythrozyten mit geringem Hb-Gehalt eine fibrinolytische Aktivität besitzen, die durch Zusatz von Streptokinase noch erheblich gesteigert werden kann. Nach ihrer Meinung dürften die Stromaten Träger der fibrinolytischen Aktivität sein, da stromatafreie Hämolsate keine Lysis auf ihren Fibrinplatten hervorriefen. Der Blutfarbstoff besäße anscheinend keine fibrino-

lytische Aktivität. Die Erythrozyten verschiedener Tiere zeigen erhebliche Unterschiede. Ein beachtliches Maß von fibrinolytischer Aktivität besitzen optisch hämoglobinfreie Stromaten von Rind, Pferd und Schwein, jedoch ist sie geringer als beim Menschen. Eine Aktivierbarkeit durch Streptokinase besteht bei Pferd und Schwein, kaum beim Rind. Erythrozyten von Meerschweinchen und Hammel zeigen dagegen keine fibrinolytische Aktivität.

Die Ergebnisse von Künzer und Haberhausen sind bemerkenswert. Wir finden in einigen Punkten unsere Ergebnisse bestätigt, in einigen anderen bestehen Gegensätze. Nach eingehender Prüfung glauben wir aber annehmen zu dürfen, daß diese Gegensätze nur scheinbare sind. Das bemerkenswerteste positive Ergebnis der genannten Autoren ist, daß es bei manchen Erythrozytenarten, und zwar insbesondere beim Menschen gelang, ein proteolytisches Ferment freizulegen. Daß die genannten Autoren sämtliche intakten Erythrozyten fibrinolytisch unwirksam finden, wir dagegen sogar hemmend, erklären wir mit der Tatsache, daß dort die Fibrinplattenmethode angewendet wurde. Unseres Erachtens kann man mit dieser Methode Hemmungseffekte nicht erkennen, sondern nur eine Unwirksamkeit oder eine Aktivierung. Wenn keine Aktivität vorliegt, kann kein Lysishof auftreten, ebenso wenn Hemmungsfaktoren vorlägen. Es ist anzunehmen, daß die genannten Autoren Hemmungseffekte intakter Erythrozyten, wie wir sie beschrieben haben, übersehen haben, übersehen mußten. Wenn sich bei den Untersuchungen von Künzer und Haberhausen stromatareiche Hämolysate in Abhängigkeit von ihrer Hämoglobinkonzentration teilweise stark hemmend erwiesen, andererseits aber bei niederem Hämoglobingehalt die fibrinolytische Aktivität erheblich ansteigt, beweist dies unseres Erachtens das gleichzeitige Vorliegen von Hemmungsfaktoren und Aktivatoren. Durch Verdünnung (= Herabsetzung der Hämoglobinkonzentration) wird die Konzentration der Hemmstoffe herabgesetzt. Auf die fibrinolytische Aktivität, als enzymatischen Vorgang wirkt sich aber eine Verdünnung nicht aus, weil die Versuchszeiten lang genug sind, um proteolytische Effekte auf alle Fälle zum Vorschein kommen zu lassen.

Weshalb sich bei Künzer und Haberhausen die Tiererythrozyten anders verhielten als die des menschlichen Blutes, vermögen wir nicht zu deuten. Bekannt ist, daß einzelne Tierplasmen recht unterschiedliche fibrinolytische Aktivität zeigen. So müßte es auch denkbar sein, daß rote Blutkörperchen Unterschiede zeigen. Wenn erwähnt wird, daß bei Pferde- und Schweineerythrozyten stromatareiche Hämolysate mit verschiedener Hämoglobinkonzentration auf erhitzten und nicht erhitzten Platten keine Lysis bewirkten, nach Streptokinasezusatz jedoch eine geringe, und zwar nur auf den nicht erhitzten Platten, so ist die hier folgende Erklärung möglich:

Fibrinplatten, mit Fibrinogen der Firma Behring hergestellt, erhalten nachweislich Plasminogen. Dieses Plasminogen ist es, welches durch Streptokinase aktiviert wird, wodurch alsdann auf der Platte Aufhellungszonen auftreten.

ZUSAMMENFASSUNG

I. Frische Erythrozyten von Mensch, Pferd, Kaninchen, Ratte, Schwein, sowie kernhaltige Vogelerythrozyten entfalten Inhibitorwirkungen bei der Fibrinolyse. Eine Regel oder Gesetzmäßigkeit im Ausmaß der Hemmung einer Artspezifität von Erythrozyten und Plasmen läßt sich nicht erkennen.

II. Eine Denaturierung von Vogelerythrozyten durch Erwärmen bewirkt keine Aufhebung ihres Hemmeffekts. Somit ist es unwahrscheinlich, daß der Hemmeffekt auf einen nativen Eiweißkörper oder ein Ferment zurückzuführen ist.

III. Auch durch organisch-chemische Lösungsmittel wie Aceton-Äther, Alkohol und Chloroform werden die Hemmungseffekte der Erythrozyten nicht beeinflußt. Daraus wird geschlossen, daß das Hemmungsprinzip nicht an Proteine oder Lipoproteide gebunden, und nicht mit enzymatischen Aktivitäten koordiniert ist, da diese Lösungsmittel eine Freilegung oder Aktivierung von Fermenten insbesondere des Fibrinolysins bewirken.

IV. Durch Hämolysen strukturzerstörte Erythrozyten zeigen folgendes: Die Erythrozytenrückstände zeigen Hemmungseffekte, die Erythrozytenüberstände sind dagegen unwirksam. Daraus wird die Arbeitshypothese abgeleitet, daß die Erythrozyten als korpuskuläre Teilchen die Fibrinolyse auf physikalisch-mechanischer Grundlage hemmen.

V. Zur Stützung dieser Hypothese wurde die Wirkung von Organhomogenaten, Tumorasцитeszellen, Hefe- und Schimmelpilzzellen, Bakterien und anorganischen Stoffen wie Tierkohlesuspension, Kieselsäuresuspension, Tricalciumphosphat, Aluminiumhydroxyd und Eisenhydroxyd auf den Ablauf der Fibrinolyse geprüft.

Es wurde gefunden: Frische Tumorasцитeszellen hemmen den Ablauf der Fibrinolyse. Erhitzte haben eine geringere Hemmwirkung. Auch bei homogenisierten Zellen findet man noch eine Hemmung im Vergleich zur Kontrolle. Diese ist

jedoch viel geringer. Es wird angenommen, daß durch die Homogenisierung Fermente der Proteolyse freigelegt werden, welche mit den vorhandenen Inhibitoren im Gleichgewicht stehen. Intakte Hefezellen und Bakterien zeigen Hemmwirkung, Schimmelpilze dagegen nicht. Bei Organhomogenaten haben wir die drei möglichen Kategorien gefunden: a) "Fibrinolyse unbeeinflusst", b) "Fibrinolyse beschleunigt". c) "Fibrinolyse gehemmt". Daraus wird als Regel abgeleitet: Organhomogenate, die nicht proteolytisch aktiv sind, sind immer auch Inhibitoren, gleichgültig ob sie erhitzt oder nicht erhitzt sind. Wenn sie dagegen proteolytisch aktiv sind, wie z.B. die Glandula submandibularis, so tritt die Hemmwirkung erst nach Erhitzen (= Zerstören von Ferment) auf.

VI. Anorganische Stoffe wie Tierkohle, Kieselgur, Tricalciumphosphat, Aluminiumhydroxyd und Eisenhydroxyd haben einen hemmenden Einfluß auf den Ablauf der Fibrinolyse oder sind indifferent. Auch diese Versuche bestätigen die These der mechanischen Beeinflussung der Fibrinolyse.

VII. Es ist nicht gelungen, die Inhibitorwirkung der Erythrozyten stofflich-chemisch zu erklären. Deshalb kommen wir auf Grund der vorliegenden Versuche zu der Annahme, daß es sich um einen wenig spezifischen physikalischen Effekt handeln könnte.

Lebenslauf

Am 8. Januar 1937 wurde ich, Gisela Neuhaus geb. Hadrossek, als älteste Tochter des Facharztes Dr. med. Alfons Hadrossek und seiner Ehefrau Gertrud geb. Newiadomsky in Hindenburg OS geboren. 1943 begann ich in Gleiwitz meine Schulzeit. Nach dem Umzug meiner Familie 1944 nach Vohburg a.D. setzte ich dort meine Schulausbildung fort. 1947 ließ sich mein Vater als prakt. Arzt in Dortmund nieder, wo ich 1956 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend begann ich das Medizinstudium an der Universität Freiburg. Nach dem Physikum 1958 wechselte ich zur Universität München. Dort legte ich im April 1962 das medizinische Staatsexamen ab. Seither war ich als Medizinalassistentin in der Krankenanstalt Dr. May in Kreuth, im städtischen Krankenhaus Harlaching bei Prof. Schrader und in der II. Frauenklinik bei Prof. Bickenbach tätig. Zur Zeit beende ich meine Medizinalassistentenzeit bei Prof. Kiese im Pharmakologischen Institut der Universität München.

Seit Oktober 1962 bin ich mit dem Bankkaufmann Robert Neuhaus verheiratet.

